

REC'D PCT/PTO 10 MAY 2005
PCT/KR 03/02425
/KR 12.11.2003
10/534433

REC'D 28 NOV 2003

WIPO PCT

#2

대한민국 특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0070106
Application Number

출원년월일 : 2002년 11월 12일
Date of Application NOV 12, 2002

출원인 : 포휴먼텍(주)
Applicant(s) FORHUMAN TECH CO.LTD.

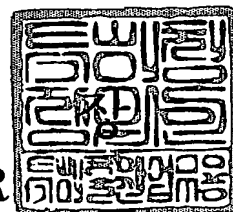
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 11 월 12 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.11.12
【발명의 명칭】	세포내 DNA / RNA 전달 방법, 및 이것의 기초 및 임상학적 응용
【발명의 영문명칭】	DNA/RNA TRANSDUCTION TECHNOLOGY AND ITS CLINICAL AND BASIC APPLICATIONS
【출원인】	
【명칭】	포휴먼텍 (주)
【출원인코드】	1-2001-016817-9
【대리인】	
【성명】	박상기
【대리인코드】	9-1998-000225-7
【발명자】	
【성명】	이상규
【출원인코드】	4-1998-034550-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이승규
【성명의 영문표기】	LEE, SEUNG KYU
【주민등록번호】	610112-1023721
【우편번호】	305-721
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 럭키하나아파트 110-501
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	채욱진
【성명의 영문표기】	CHAE, WOOK JIN
【주민등록번호】	750503-1001317
【우편번호】	150-010
【주소】	서울특별시 영등포구 여의도동 수정아파트 C-502
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 최제민
 【성명의 영문표기】 CHOI, JE MIN
 【주민등록번호】 770109-1036419
 【우편번호】 151-061
 【주소】 서울특별시 관악구 봉천11동 은천아파트 206동 704호
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 양정진
 【성명의 영문표기】 YANG, JUNG JIN
 【주민등록번호】 620803-2011426
 【우편번호】 137-907
 【주소】 서울특별시 서초구 잠원동 잠원현대아파트 101동 205호
 【국적】 KR

【심사청구】 청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 7
 【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 박상기 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원
 【가산출원료】 19 면 19,000 원
 【우선권주장료】 0 건 0 원
 【심사청구료】 10 항 429,000 원
 【합계】 477,000 원
 【감면사유】 소기업 (70%감면)
 【감면후 수수료】 143,100 원

【첨부서류】 1. 위임장[추후제출]_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 PTD (Protein Transduction Domain)와 DNA/RNA 결합인자 (binding factor)를 이용하여 생체기능을 조절하는 물질을 코딩하는 DNA/RNA를 생체내 (*in vivo*) 및 생체외 (*in vitro*)에서 진핵 또는 원핵세포 내부의 세포질 또는 핵내로 효과적으로 전달하는 방법에 관한 것으로서, 특히 생체내의 경우 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막 및 흡입등을 포함한 다양한 경로를 통하여 세포내로 전달할 수 있다. 따라서 본 발명은 DNA/RNA 백신 (vaccine) 및 유전자 치료등의 의약적 응용 및 기초연구분야에서 각종세포, 세포에 DNA/RNA를 전달하여 일시적 (transient) 또는 지속적 (permanent)으로 발현시키는 기술에 이용될 수 있다.

【대표도】

도 1a

【색인어】

PTD, 결합단백질

【명세서】

【발명의 명칭】

세포내 DNA / RNA 전달 방법, 및 이것의 기초 및 임상학적 응용 {DNA/RNA
TRANSDUCTION TECHNOLOGY AND ITS CLINICAL AND BASIC APPLICATIONS}

【도면의 간단한 설명】

도 1a 내지 도 1c는 본 발명의 재조합 발현벡터의 구조를 나타낸다.

도 2a 및 도 2b는 도 1의 각 발현벡터를 제한효소로 처리한 후 아가로스겔을 나타낸다.

도 3은 발현벡터로부터 발현되고, 분리 정제된 융합단백질에 대한 코우마쉬 블루 염색결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 Sim2-Gal4, Mph1-Gal4, Tat-Gal4, 또는 R7-Gal4에 의해 주르캣트 (Jurkat) T세포 내로 전달되어 발현된, CD8-z, Lck, 인슐린 (INS) 단백질을 CD8, Lck 또는 INS에 대한 mAb를 이용한 웨스턴블롯 (westernblot)으로 검출한 것을 나타낸다.

도 5는 Sim2-Gal4, Mph1-Gal4, Tat-Gal4, 또는 R7-Gal4에 의해 Hela 세포 내로 전달되어 발현하는 CD8-z, Lck, INS 단백질을 CD8, Lck 또는 INS에 대한 mAb를 이용한 웨스턴블롯 (westernblot)으로 검출한 것을 나타낸다.

도 6a 내지 도 6d는 Sim2-Gal4, Mph1-Gal4, Tat-Gal4, 또는 R7-Gal4에 의하여 pCD8-z-GBS, pLck-GBS 또는 pINS-GBS를 I.P. 방법으로 마우스에 주입한 후, 심장 (도 6a), 간 (도 6b), 신장 (도 6c), 비장 (도 6d) 등의 장기에서 발현된 CD8-z, Lck, 인슐린을 이들에 대한 mAb로 검출한 것이다.

도 7a 내지 도 7c는 Sim2-Gal4, Mph1-Gal4, Tat-Gal4, 또는 R7-Gal4에 의하여 pL-CD8-z-GBS, pL-Lck-GBS 또는 pL-INS-GBS를 I.P. 방법으로 마우스에 주입한 후, 각각의 단백질이 T세포에 특이적으로 발현된 것을 나타낸다.

도 8a 내지 도 8c는 Sim2-Gal4, Mph1-Gal4, Tat-Gal4, 또는 R7-Gal4에 의하여 pL-CD8-z-GBS, pL-Lck-GBS 또는 pL-INS-GBS를 I.P. 방법으로 마우스에 주입한 후, 각각의 단백질이 T세포에 특이적으로 발현된 것을 나타낸다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<9> 본 발명은 생물학적 활성을 갖는 생체기능조절물질을 생체 내 (*in vivo*) 및 생체 외 (*in vitro*)에서 진행 또는 원핵세포 내부의 세포질 또는 핵 내로 효과적으로 전달할 수 있는 방법에 관한 것이다.

<10> 일반적으로, 살아있는 세포는 단백질과 핵산과 같은 거대 분자에 대해서 불투과성이다. 일부 작은 물질들만이 매우 낮은 비율로 살아있는 세포의 세포막을 통과하여 세포 내부의 세포질 또는 핵으로 들어갈 수 있는 반면에, 거대분자는 세포 내부로 들어갈 수 없다는 사실은, 단백질 또는 핵산을 포함하는 거대분자를 이용한 치료, 예방 및 진단에 대한 제한 요인이 되고 있다. 한편, 대부분의 치료, 예방 및 진단의 목적으로 제조되는 물질들은, 이것의 진단, 예방 및 치료적 유효량이 세포내로 전달되어야 하므로 이들을 세포 외부나 표적 세포의 표면에서 작용시

켜 세포내로 전달시키기 위한 여러 가지 방법들이 개발되었다. 이와 같이, 생체 외 (*in vitro*) 에서 세포내로 거대 분자를 전달하는 방법에는, 전기충격 (electroporation), 리포솜을 이용한 막 융합, 표면에 DNA가 코팅된 미세 투사체를 이용한 고농도 투사법, 칼슘-인-DNA 침전체를 이용한 배양법, DEAE-덱스트란을 이용한 트랜스펙션 (transfection), 변형된 바이러스 핵산을 이용한 감염, 단일 세포로 직접 미세 주입하는 방법 등이 있다. 그러나, 이러한 방법들은 전형적으로 거대 분자를 주입시키고자 하는 전체 세포 수 중의 단지 일부에만 전달할 수 있을 뿐이며, 다른 많은 수의 세포에 바람직하지 않은 영향을 주는 경향을 나타낸다. 또한, 생체 내에서 세포 내로 거대 분자를 실험적으로 이동시키는 방법으로서, 스크래프 로딩 (scrape loading), 칼슘-인 침전, 라이포솜을 이용하는 방법 등이 성공된 바 있으나, 이러한 기술들은 생체 내에서 세포내로 물질을 전달함에 있어 그 사용이 극히 제한적이라는 문제점이 있다.

<11> 따라서 생체 내부 및 외부 모두에서 세포를 손상시키지 않고 생물학적 활성을 지닌 거대 분자를 생물학적으로 효과적으로 전달하는 일반적인 방법이 필요하게 되었다 [참고문헌: L.A. Sternson, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 57, 19-21 (1987)]. 이와 같은 방법의 예로서, 지질 펩타이드의 화학적인 추가 [참고문헌: P. Hoffmann et al. *Immunobiol.*, 177, 158-170(1988)] 또는 폴리라이신이나 폴리알지닌 같은 염기성 중합체를 사용하는 방법 [참고문헌: W-C. Chen et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75, 1872-1876(1978)]이 있으나, 이들 방법은 아직 검증되지 않았다. 수송체로서 사용되는 엽산 [참고문헌: C.P. Leamon and Low, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88, 5572-5576(1991)]은 엽산-염 결합체로서 세포내로 이동된다는 사실이 보고되었으나, 세포질 안으로까지 전달되는 지는 아직 확인된 바가 없다. 또한, 슈도모나스 외독소 (*Pseudomonas Exotoxin*)도 수송체의 한 종류로서 사용되고 있다 [참고문헌: T. I. Prior et al., *Cell*, 64, 1017-1023(1991)]. 그러나, 이들 방법에서도 생물학적으로 활성화된 '전달될' 물질의 세포내로의 이동에 관한 효과 및 이것의 일반적인 적용 가능성에 대해서는 명확하지 않다. 따라서 살아있는 세포의 세포질이나 핵 안으로 생물학적으로 활성화된 물질을 보다 더 안전하고 효과적으로 전달할 수 있는 방법이 계속적으로 요구되고 있는 실정이다.

<12> 이러한 요구에 대한 연구의 결과로서 제시된 것으로 PTD (Protein Transduction Domain)가 있으며, 이중 가장 많은 연구가 진행된 것은 인간 면역 결핍 바이러스-1 (Human Immunodeficiency Virus-1, HIV-1)의 전사인자인 Tat 단백질이다. 이 단백질은 세포막을 통과함에 있어 86개의 아미노산으로 구성된 완전한 형태일 때 보다 양전하를 갖는 아미노산들이 집중적으로 분포되어 있는 47번째부터 57번째 아미노산 (YGRKKRRQRRR)의 일부분으로 구성된 형태일 경우가 더욱 효과적임이 밝혀졌다 [참고문헌: Fawell S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 664-668(1994)]. 이와 같이, PTD로서의 효과가 확인된 다른 예로는 HSV-1 (Herpes Simplex Virus type 1)의 VP22 단백질의 267번째부터 300번째까지의 아미노산 [참고문헌: Elliott G.

et al. Cell, 88,223-233(1997)], HSV-2의 UL-56단백질의 84번째부터 92번째까지의 아미노산 (GeneBank code : D1047[gi:221784]) 및 드로소필라 (*Drosophila*)의 ANTP (*Antennapedia*) 단백질의 339번째부터 355번째까지의 아미노산 [참고문헌: Schwarze S.R. 21, 45-48(2000)] 등이 있으며, 전기적으로 양성인 아미노산들을 나열한 인위적인 펩타이드의 경우도 그 효과가 확인되었다 [참고문헌: Laus R. *et al. Nature Biotechnol.* 18, 1269-1272(2000)].

- <13> 본 발명자들은 PTD에 DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인을 융합시켜 수득한 융합단백질을 이용함에 의해, 세포내로의 DNA/RNA를 포함하는 생체기능조절물질의 전달을 획기적으로 개선시킬 수 있을 뿐만아니라, 특히 특정 세포, 조직, 또는 장기에 특이적으로 또는 특정 자극에 의해 유도되는 방법으로 생체기능조절물질을 전달할 수 있다는 발견에 기초하여 본 발명은 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <14> 본 발명의 목적은 생체 내 (

in vivo) 및 생체 외 (*in vitro*)에서 선택적인 DNA/RNA 결합서열 (DNA Binding Sequence, DBS)를 가진 생체기능조절단백질을 코딩하는 DNA/RNA, 및 상기 DNA/RNA의 DBS와 선택적으로 결합할 수 있는 DNA/RNA 결합인자 (binding factor) 또는 이것의 일부인 DNA/RNA 결합도메인 (DNA Binding Domain, DBD)을 지닌 동종 또는 하나 이상의 결합단백질과 PTD의 융합단백질을 상온에서 결합시킨 후, PTD에 의하여 생체외에서는 세포주, 생체내에서는 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막 또는 흡입등의 투여경로를 통하여 각 장기에 생체기능조절 단백질을 코딩하는 DNA/RNA를 전달하여 단백질을 발현시키는 방법을 제공하는 것이다. 특히, 생체 기능조절단백질을 코딩하는 DNA/RNA와 함께 이것이 발현되는 세포, 장기, 조직에 선택적인 프로모터를 (promoter)를 포함하는 경우, 체내 특정 부위에 선택적으로 생체기능조절단백질을 발현시킬 수 있는 장점이 있다.

<15> 본 발명의 다른 목적은, 상기 방법을 이용하여 생체내 및 생체외에서 단백질, DNA/RNA, 지방, 탄수화물, 및 화학화합물로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 생체기능조절물질을 진핵 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵내로 전달하는 방법을 제공하는 것이다.

<16> 본 발명의 다른 목적은 상기 방법을 이용하여 DNA/RNA 백신 및 유전자 치료 방법을 제공하고, 다양한 종류의 원핵 또는 진핵세포에 원하는 DNA/RNA를 전달하여 이들을 안정적으로 또는 일시적으로 발현시키는 방법에 관한 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<17> 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 특이적인 DNA/RNA 결합서열과 결합할 수 있는 DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인 (DBD)을 지닌 동종 또는 이종의 하나 이상의 결합단백질과 PTD (Protein Transduction Domain)의 융합단백질, 및 각각 이들 결합단백질과 PTD를

코딩하는 DNA를 포함하고 발현조절서열이 작동적으로 결합된 물질전달 재조합 발현백터를 제공한다.

- 18> 또한, 본 발명은 상기 DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인과 특이적으로 결합하는 DNA/RNA 결합서열을 3' 또는 5' 말단에 가진 생체기능조절단백질을 코딩하는 DNA/RNA, 및 상기 단백질이 발현되는 세포, 장기, 조직에 선택적인 프로모터 (promoter)가 발현조절서열로서 작동적으로 결합된 재조합 발현백터를 제공한다.
- 19> 또한, 본 발명은 상기 DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인과 특이적으로 결합하는 DNA/RNA 결합서열에 화학적 또는 물리적 공유 또는 비공유 결합에 의해 결합된 것으로서, 단백질, DNA/RNA, 지방, 탄수화물, 및 화학화합물로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 생체기능조절물질을 포함하는 DNA 구조를 제공한다.
- 20> 본 발명은 또한 DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인을 지닌 동종 또는 이종의 하나 이상의 결합단백질과 PTD의 융합단백질; 및 단백질, DNA/RNA, 지방, 탄수화물, 및 화학화합물로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 생체기능조절물질이 화학적 또는 물리적 공유 또는 비공유 결합에 의해 결합된, 세포질 또는 핵내로 생체기능조절물질을 전달하기 위한 결합복합체를 제공한다.
- 21> 또한, 본 발명은 DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인을 지닌 동종 또는 이종의 하나 이상의 결합단백질과 PTD의 융합단백질; 및 상기 DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인과 특이적으로 결합하는 DNA/RNA 결합서열, 생체기능조절물질을 코딩하는 DNA, 및 발현조절서열이 작동적으로 결합된 재조합 발현백터가 결합된, 세포질 또는 핵내로 DNA를 전달하기 위한 결합복합체를 제공한다.

- 22> 또한, 본 발명은 DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인 (DBD)을 가진 단백질과 PTD의 융합단백질을 이용하여, 상기 결합인자 또는 DBD과 선택적으로 결합할 수 있는 DBS를 함유한 생체기능조절단백질을 코딩하는 DNA/RNA를 생체내 또는 생체외에서 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막, 및 흡입 등을 포함하는 다양한 경로를 통하여 진핵 또는 원핵세포와 접촉시켜 진핵 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 안으로 전달하여 발현시키는 방법을 제공한다.
- 23> 본 발명에 따른 방법은 i) DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인을 지닌 동종 또는 이종의 하나 이상의 결합단백질 및 PTD를 각각 코딩하는 DNA, 및 발현조절서열이 작동적으로 결합된 물질전달 재조합 발현벡터를 제조하는 단계; ii) 상기 단계 i)의 물질전달 재조합 발현벡터를 숙주세포에서 발현시켜 융합단백질을 수득하는 단계; iii) 상기 단계 ii)의 융합단백질과 단백질, DNA/RNA, 지방, 탄수화물, 및 화학화합물로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 생체기능조절물질을 화학적 또는 물리적 공유 또는 비공유 결합에 의해 연결시켜 결합복합체를 수득하는 단계; 및 iv) 상기 단계 iii)의 결합복합체를 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막 또는 흡입을 포함하는 투여 경로를 통해 생체내로 또는 생체외에서 세포의 배양물과 혼합 배양시키는 단계를 포함하여, 생체기능조절물질을 진핵세포 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵안으로 전달하는 방법을 제공한다.
- <24> 본 발명에 따라 제공되는 다른 방법은, i) DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인을 지닌 동종 또는 이종의 하나 이상의 결합단백질 및 PTD (Protein Transduction Domain)를 코딩하는 DNA, 및 발현조절서열이 작동적으로 결합된 물질전달 재조합 발현벡터를 제조하는 단계; ii) 상기 단계 i)의 물질전달 재조합 발현벡터를 숙주세포에서 발현시켜 융합단백질을 수득하는 단계; iii) 생체기능조절물질을 코딩하는 DNA 및 상기 DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA

결합도메인과 특이적으로 결합하는 DNA/RNA 결합서열 둘 모두를 포함하고, 발현벡터가 작동적으로 결합된 재조합 발현벡터를 제조하는 단계; iv) 상기 단계 ii)에서 수득한 융합단백질과 단계 iii)의 재조합 발현벡터를 결합시켜 결합복합체를 수득하는 단계; 및 v) 상기 단계 iv)의 결합복합체를 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막 또는 흡입을 포함하는 투여 경로를 통해 생체내로 또는 생체외에서 세포의 배양물과 혼합 배양시키는 단계를 포함하여, 생체기능조절물질을 진핵세포 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 안으로 전달하는 것이다.

<25> 본 발명은 또한 DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인 (DBD)을 가진 결합단백질과 PTD의 융합단백질을 이용하여, 상기 결합인자 또는 DBD과 선택적으로 결합하는 DBS에 화학적 또는 물리적 공유 또는 비공유 결합에 의해 연결된 생체기능조절물질을 생체내 또는 생체외에서 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막, 및 흡입 등을 포함하는 다양한 경로를 통하여 진핵 또는 원핵세포와 접촉시켜 진핵 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 안으로 전달하는 방법을 제공한다.

<26> 본 명세서에서, "PTD"는 이들과 화학적, 물리적 공유 또는 비공유 결합에 의하여 직접 또는 다른 매개체를 이용하여 간접적으로 연결된 특정 단백질을 진핵 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵내로 전달가능한 물질전달 펩타이드로서 예를 들어, Sim-2 [참고문헌: Chrast R. *et al. Genome Res.* 7, 615-624 (1997)], Mph1 [참고문헌: M.J Alkema *et al.*, *Genes Dev.* 11(2), 226-240(1997)], Tat [참고문헌: Fawell S. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 664-668(1994)], R7 (Cell Gate, U.S.A.), SM5 (Dr. Quin, Vanderbilt University), VP22 [참고문헌: Elliott G. *et al. Cell*, 88,223-233(1997)], ANTP [참고문헌: LeRoux I, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9120-9124 (1993)], Pep-1 및 Pep-2 [참고문헌: May C. Morris *et al. Nature Biotechnology*, 19, 1173-1175(2001)] 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

- <27> 본 명세서에서, "DNA/RNA 결합인자" 또는 "DNA/RNA 결합도메인 (DBD)"은 특이적인 DNA/RNA 서열과 결합할 수 있는 단백질의 전체 또는 일부로서 예를 들어, 전사인자 (transcriptional factor) 또는 바이러스 단백질 (viral protein) 등을 포함한다.
- <28> 본 명세서에서, "결합단백질"이란 DNA/RNA 결합인자 (binding factor) 또는 이것의 일부인 DNA/RNA 결합도메인을 지닌 동종 또는 하나 이상의 단백질을 의미하는 것으로 이해된다.
- <29> 본 명세서에서, "선택적인 프로모터"는 단백질을 코딩하는 유전자를 특정 조직, 세포, 장기에 발현시킬 수 있는 프로모터로서 예를 들어; T세포에 선택적으로 발현하는 Lck, CD2 프로모터, 췌장 (pancreas)에 특이적으로 발현하는 인슐린 프로모터 (insulin promoter) 등을 포함하며, 또한 프로모터는 유도성 프로모터일 수 있다.
- <30> 본 발명은 또한 PTD를 코딩하는 DNA, 및 DBD를 갖는 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 물질전달 재조합 발현백터를 제공한다.
- <31> 상기 물질전달 재조합 발현백터는, 융합단백질의 정제를 용이하게 하는 태그(tag) 서열 예를 들어, 연속된 히스티딘 코돈, 헤마글루티닌 코돈, Myc 코돈, 말토우즈 결합 단백질 코돈 등을 포함할 수 있다. 또한 융합단백질의 불필요한 부분을 제거하기 위하여 엔테로키나제, 인자 X (Factor X), 트롬빈 (Thrombin) 등 특정 효소에 의해 특이적으로 절단되는 서열, 발현조절서열 및 세포내 전달을 확인하기 위한 마아커 (marker) 또는 리포터 유전자 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님은 물론이다.
- <32> 하기 실시예에 제시되는 바와 같이, 본 발명의 물질전달 재조합 발현백터 pPTD-Gal4 예컨대, pSim2-Gal4, pMph1-Gal4, pTat-Gal4 또는 pR7-Gal4는, 세포내 물질전달 펩타이드 (PTD) 예를 들어, Sim-2, Mph-1, Tat 또는 R7를 코딩하는 DNA, 숙주세포에서 발현된 단백질의 정제를

위한 6개의 연속된 히스티딘 코돈, 엔테로키나제에 의해 특이적으로 절단되는 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 서열, 및 Gal4 결합서열과 특이적으로 결합할 수 있는 Gal4 DNA 결합인자를 코딩하는 DNA를 포함한다.

<33> 본 발명의 pPTD-Gal4 벡터는 pTrcHisB 벡터 (Invitrogen)를 주형으로 하여 통상의 PCR (polymerase chain reaction) 방법에 의해 간단히 제조될 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면 물질전달 재조합 발현벡터내의 Gal4 유전자 (Invitrogen)를 적합한 제한효소를 이용하여 제거하고, 특정 DNA 서열과 결합할 수 있는 DNA 결합인자의 전체 또는 일부를 코딩하는 DNA를 삽입함으로써 다양한 유형의 물질전달 재조합 발현벡터를 제조할 수 있다. 본 실시예에서 DNA 결합인자 (DNA Binding Factor)로서 사용된 Gal4는, 원핵 또는 진핵세포, 바이러스 등에 존재하는 전사인자 (transcription factor)의 전부 또는 일부인 DNA 결합도메인으로서, 상기 Gal4는 특정 세포, 조직 또는 장기 등에 대한 특이적 전달을 위해 이들 세포, 조직 또는 장기 등에 특이적으로 존재하는 수용체 또는 리간드, 또는 이들과 선택적으로 결합하는 단클론항체가 화학적, 물리적 방법에 의해 연결되어 결합단백질을 형성할 수 있으며, 이들 Gal4와 연결되는 물질은 단백질외에도 지방, 탄수화물 또는 이들의 복합체 일 수 있다. 본 발명에 적용 가능한 Gal4와 융합단백질은 세포내 물질전달 펩타이드와 화학적 또는 물리적 결합에 의해 연결되는 DNA, RNA 탄수화물, 지방 또는 화합물 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

<34> 본 발명의 물질전달 재조합 발현벡터를 이용하여, 물질전달 펩티드와 융합된 단백질을 목적 단백질로서 수득하고자 하는 경우, 상기 물질전달 재조합 발현벡터를 사용하여 대장균 등 적절한 숙주세포를 형질전환시키고, 수득된 형질전환체를 적절한 조건 하에서 배양하여 융합단백질을 생산한 다음, 공지된 통상의 단백질 정제 방법 예를 들어, 폴리히스티딘과 Ni^{2+} -NTA 간

의 결합을 사용한 방법 등을 사용함에 의해 목적 단백질을 분리한 후, 필요에 따라 정제하여 이용할 수 있다.

<35> 또한 본 발명은, 물질전달 펩타이드 또는 이것의 유사체 또는 물질전달펩타이드와 결합 단백질과의 융합단백질을 결합유도체로 활성화시키고 이것을 목적하는 생체기능조절물질과 결합반응시켜 결합복합체를 수득하는 단계, 및 상기 수득한 결합복합체를 목적 생체기능조절물질을 전달하고자 하는 세포의 배양물과 혼합배양함에 의해 세포내로 목적 생체기능조절물질을 전달하는 단계를 포함하는 물질전달 방법을 제공하며, 뉴클리어 로컬라이제이션 서열 (Nuclearlocalization sequence) (NLS)이 융합단백질의 물질전달 펩타이드 (PTD)와 추가로 결합될 수 있다. 상기 결합유도체에는, PTD (물질전달 펩타이드) 또는 PTD와 목적 단백질의 융합단백질을, 목적 생체기능조절물질 예컨대, DNA, RNA, 탄수화물, 지방, 단백질 또는 화학화합물과 화학적 및/또는 물리적 방법에 의해 결합시키는 결합시약 예를 들어, BMOE (Pierce Cat. No 22323), DSP (Pierce Cat. No 22585)등이 포함된다.

<36> 또한, 상기에서 생체기능조절물질을 세포내로 전달함에 있어, 이들을 물질전달 펩타이드와 결합단백질의 융합단백질과 물리적 화학적으로 결합시켜 특정한 세포, 조직 또는 장기로 전달하고자 하는 경우, 결합단백질은 전달하고자 하는 특정한 세포, 조직, 장기에 특이적으로 발현하는 수용체 또는 리간드 단백질 또는, 이들 리간드와 특이적으로 결합할 수 있는 mAb 및 이것의 변형된 형태 일 수 있다.

<37> 한편, 생체기능조절물질은 그 자체로서 특정 종 (species), 조직, 장기 또는 세포에서 특이적으로 유전자를 발현시키는 프로모터 및/또는 인핸서 (enhancer)일 수 있다.

<38> 본 발명의 세포내 물질전달 펩타이드는 매우 작은 크기의 펩타이드 이므로 혹시 발생할 수 있는 활성물질에 대한 생물학적 간섭을 최소화할 수 있다.

<39> 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 보다 더 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

<40> 실시예

<41> 실시예 1: 재조합발현벡터의 제조

<42> 물질전달 펩타이드와 DBD를 지닌 결합단백질의 융합단백질에 대한 물질전달 재조합 발현 벡터의 제조 (pSim2-Gal4, pMph1-Gal4, pTat-Gal4, pR7-Gal4, pCD8-z-GBS)

<43> 물질전달 펩타이드로서, Sim-2 유전자 (N말단으로부터 558 번째 아미노산인 알라닌으로부터 566번째 아미노산인 아르기닌까지), Mph-1 유전자 (N말단으로부터 858 번째 아미노산인 타이로신 으로부터 868번째 아미노산인 아르기닌까지), HIV의 Tat 유전자 (N말단으로부터 47 번째 아미노산인 타이로신으로부터 57번째 아미노산인 아르기닌까지) 또는 아미노산 아르기닌을 7개가진 펩타이드를 코딩하는 염기서열을 사용하였고, DBD를 지닌 결합단백질로서 Gal4 (Invitrogen사로부터 입수 가능) 사용하였다. 상기 물질전달 펩타이드 및 Gal4-결합서열 (GBS) 과 결합하는 Gal4를 코딩하는 염기서열을 결합시키기 위하여, Sim-2의 N말단으로부터 558번째 인 알라닌으로부터 566번째 아미노산인 아르기닌, Mph-1의 N말단으로부터 858 번째 아미노산인 타이로신 으로부터 868번째 아미노산인 아르기닌까지, Tat의 N말단으로부터 47 번째 아미노산 인 타이로신으로부터 57번째 아미노산인 아르기닌까지, 또는 7개의 아르기닌 아미노산 및 클로닝을 위한 제한효소 BamH I에 해당하는, 각각 서열번호 1, 2, 3, 4의 프라이머 및 이 4개의 DNA구조를 제작하기 위하여 Gal4의 3 말단에 해당하는 서열번호 5의 프라이머를 합성하고,

Gal4 단백질의 전체 유전자가 포함되어 있는 벡터 (Clontech사로부터 입수가능)를 주형으로 하여 pfu turbo DNA 폴리머라제 (Strategen)를 사용하여 PCR을 수행하였다.

<44> 본 실시예 1에서, 서열번호 1은 pSim2-gal4를 제작하기 위한 5' 프라이머의 염기서열을 나타내고, 서열번호 2는 pMph1-Gal4를 제작하기 위한 5' 프라이머의 염기서열을 나타내며, 서열번호 3은 pTat-Gal4를 제작하기 위한 5' 프라이머의 염기서열을 나타내고, 서열번호 4는 pR7-Gal4를 제작하기 위한 5' 프라이머의 염기서열을 나타내며, 서열번호 5는 pSim2-Gal4, pMph1-Gal4, pR7-Gal4과 pTat-Gal4를 제작하기 위한 3' 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

<45> DNA 결합서열 (GBS)을 포함하고 생체기능조절물질을 코딩하는 재조합벡터의 제조
(pLck-GBS, pINS-GBS, pL-CD8-z-GBS, pL-LCK-GBS, pL-INS-GBS)

<46> Lck 또는 인슐린을 코딩하는 유전자를 가지고 있는 발현벡터 pCDNA-Lck 또는 pCDNA-INS의 제한효소 부위에서 DNA 결합서열로서 Gal4와 특이적으로 결합하는 Gal4 결합서열 (GBS)를 5'과 3' 말단에 Stu I 제한효소를 가지고 있는 서열번호 6와 7의 프라이머를 제작하여 pGAD를 주형으로 하여 역시 같은 방법으로 PCR을 수행하였다. PCR에서 수득한 반응생성물을 PCR 정제 키트 (Qiagen)을 사용하여 정제한 후 Bgl II 및 BamH I 제한효소를 사용하여 48시간동안 처리하고 1% 아가로스겔에서 분리정제 한 다음 전기영동하고 에티움 브로마이드 (ethium bromide)로 염색하였다.

<47> 또한, Lck-GBS, INS-GBS 및 CD8-z-GBS의 각각의 DNA를 pLck-GBS, pINS-GBS, pCD8-z-GBS로부터 제한효소 처리하여 분리한 후, T세포에 선택적으로 발현하는 Lck 프로모터를 가진 발현 벡터인 pLck-Luc에 클로닝하였다. 상기 방법에 따라 클로닝하여 제작된 재조합발현벡터를 pSim2-Gal4(a), pMph1-Gal4(b), pTat-Gal4(c), pR7-Gal4(d), pCD8-z-GBS(e), pLck-GBS(f),

pINS-GBS(g), pL-CD8-z-GBS(h), pL-Lck-GBS(i) 및 pL-INS-GBS(j)라 명명하고 그 구조를 도 1a 내지 도 1c에 나타내었다.

<48> 서열번호 6은 Gal4 결합서열 (Binding Sequence) (GBS)를 제작하기 위한 5' 프라이머의 염기서열을 나타내고, 서열번호 7은 Gal4 결합서열 (GBS)를 제작하기 위한 3' 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

<49> 실시예 2: 대장균 형질전환제의 제조, 및 융합단백질의 발현 및 정제

<50> 상기 실시예 1에서 제조된 각각의 발현벡터 pSim2-Gal4(a), pMph1-Gal4(b), pTat-Gal4(c), pR7-Gal4(d)를 사용하여 대장균 DH5 (ATCC No. 53863)를 열충격 형질전환 방법 (Heat shock transformation)으로 형질전환 시킨 다음, 형질 전환된 대장균을 100ml의 LB 배지에 2ml의 양으로 접종하고 12시간 동안 37℃에서 교반하면서 전 배양하였다. 다음, 이를 다시 각각 1000ml의 LB 배지에 접종하고 37℃에서 4시간 동안 배양한 후, 1mM 농도의 IPTG (이소프로필-D-티오갈락토피라노사이드, GibcoBRL cat.# 15529-019)를 첨가하여 lac 오페론의 발현을 유도하고 8시간 동안 배양하여 융합단백질의 발현을 유도하였다.

<51> 상기 배양액을 4℃에서 6,000rpm으로 20분간 원심분리하여 펠렛만 남기고 상등액을 제거한 후, 1mg/ml의 리소자임 (Sigma, cat.# L-7651)이 포함된 10ml의 완충용액 1 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM 이미다졸, pH 8.0)로 펠렛을 풀어준 다음, 얼음에서 30분간 방치한 후, 초음파 분쇄기(Heat systems, ultrasonic processor XL)를 사용하여 300W의 세기로 10초간 초음파를 주입하고 10초간 냉각하는 과정을 반복하여 누적 초음파 주입시간이 3분이 되게 하였다. 용출액을 4℃에서 12,000rpm으로 20분간 원심분리하여 대장균의 파쇄물을 제거하고 순수한 용출액만을 분리하였다.

<52> 분리된 용출액에 2.5ml의 50% Ni^{2+} -NTA 아가로스 슬러리 (Qiagen, cat# 30230)를 넣고 4℃에서 200rpm으로 1시간 동안 교반하여 융합단백질과 Ni^{2+} -NTA 아가로스를 결합시키고, 이 혼합액을 크로마토그래피용 0.8 x 4 cm 칼럼 (BioRad, cat.# 731-1550)에 넣어 흘려주었다. 4 ml의 완충용액 2 (50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 20mM 이미다졸, pH 8.0)를 사용하여 두 차례 세척을 한 후, 0.5ml의 완충용액 3 (50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 250mM 이미다졸, pH 8.0)으로 네 차례에 나누어 융합단백질을 분획하고, SDS-PAGE를 실시한 후 코우마쉬 블루 염색법으로 확인하여 도 3에 나타내었다. 도 3에서, 제 1열은 표준분자량 단백질이고, 각각 Sim2-Gal4(a), Mph1-Gal4(b), Tat-Gal4(c), R7-Gal4(d) 이다.

<53> 실시예 3: Sim2-Gal4, Mph1-Gal4, Tat-Gal4 또는 R7-Gal4에 의한 DNA의 주르캐트 (Jurkat) T세포내 전달 및 발현 (*in vivo*)

<54> 실시예 2에서 분리정제된 융합단백질 Sim2-Gal4, Mph1-Gal4, Tat-Gal4, R7-Gal4를 선형화된 DNA구조인 pCD8-z-GBS, pLck-GBS, pINS-GBS와 37℃에서 결합시킨 후, 5×10^5 의 주르캐트 세포 (ATCC No. TIB-152)를 35mm 배양접시에 1ml씩 넣고 37℃에서 30분동안 반응시켰다. 반응을 종료하고 세포를 포집하여 용출완충용액 [0.2% 트리톤 X-100, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 400 M EDTA, 1mM Na_3VO_4 , 10mM NaF, 1mM PMSF, 10g 아프로티닌(aprotinin), 10g 로펩틴 (leupeptin)] 100ml로 4℃에서 30분간 반응시키고 14,000rpm으로 15분간 원심분리하여 세포용출액을 수득했다.

<55> 이들 세포용출액을 SDS-PAGE 겔에서 분리한 후 CD8에 대한 mAb (OKT8), Lck에 대한 mAb, INS에 대한 mAb을 이용하여 웨스턴 블롯으로 발현된 단백질을 검출하였다. 이에 대한 결과도 도 4에 나타냈으며(INS에 대한 결과는 도시하지 않음) 제 1열은 표준분자량 단백질이고, 각각

Sim2-Gal4에 의한 전달: CD8-z(a), Lck(e); Mph1-Gal4에 의한 전달: CD8-z(b), Lck(f);

Tat-Gal4에 의한 전달: CD8-z(c), Lck(g); R7-Gal4에 의한 전달: CD8-z(d), Lck(h)이다.

<56> 실시예 4: Sim2-Gal4, Mph1-Gal4, Tat-Gal4 또는 R7-Gal4에 의한 DNA의 Hela 세포내로의 전달 및 발현 (*in vitro*)

<57> 실시예 3과 같은 방법으로 Sim2-Gal4, Mph1-Gal4, Tat-Gal4 또는 R7-Gal4에 결합된 pCD8-z-GBS, pLck-GBS, pINS-GBS를 Hela 세포내로 같은 방법으로 전달하여 세포내에서 발현된 CD8-z, Lck, 인슐린(INS)을 웨스턴 블롯 방법으로 검출하였다. 그 결과를 인슐린을 제외하고 도 5에 나타내었으며, 제 1열은 표준분자량단백질이고, 각각 Sim2-Gal4에 의한 전달: CD8-z(a), Lck(e); Mph1-Gal4에 의한 전달: CD8-z(b), Lck(f); Tat-Gal4에 의한 전달: CD8-z(c), Lck(g); R7-Gal4에 의한 전달: CD8-z(d), Lck(h)이다.

<58> 실시예 5: Sim2-Gal4, Mph1-Gal4, Tat-Gal4 또는 R7-Gal4에 의한 생체내 DNA의 전달 및 발현

<59> 상기 실시예 4에서 제조된 Sim2-Gal4, Mph1-Gal4, Tat-Gal4 또는 R7-Gal4 융합단백질과 pCD8-z-GBS, pLck-GBS, pINS-GBS DNA와의 결합 복합체를, C57B6 마우스에 I.P. 방법으로 0.5mg/ml을 주입하고 4시간 경과 후 심장, 간, 신장, 비장 (spleen) 등의 장기를 적출하여 이를 장기에 전달되어 발현된 CD8-z, Lck, 인슐린을 이들에 대한 mAb를 이용한 웨스턴블롯 방법으로 검출하였다. 그 결과를 인슐린을 제외하고 도 6a 내지 도 6d에 나타내었다.

<60> i) 심장 (도 6a): 제 1열은 표준분자량단백질이고, 각각 Sim2-Gal4에 의한 전달: CD8-z(a), Lck(e); Mph1-Gal4에 의한 전달: CD8-z(b), Lck(f); Tat-Gal4에 의한 전달: CD8-z(c), Lck(g); R7-Gal4에 의한 전달: CD8-z(d), Lck(h)이다.

- <61> ii) 간 (도 6b): 제 1열은 표준분자량단백질이고, 각각 Sim2-Gal4에 의한 전달: CD8-z(a), Lck(e); Mph1-Gal4에 의한 전달: CD8-z(b), Lck(f); Tat-Gal4에 의한 전달: CD8-z(c), Lck(g); R7-Gal4에 의한 전달: CD8-z(d), Lck(h)이다.
- <62> iii) 신장 (도 6c): 제 1열은 표준분자량단백질이고, 각각 Sim2-Gal4에 의한 전달: CD8-z(a), Lck(e); Mph1-Gal4에 의한 전달: CD8-z(b), Lck(f); Tat-Gal4에 의한 전달: CD8-z(c), Lck(g); R7-Gal4에 의한 전달: CD8-z(d), Lck(h)이다.
- <63> iv) 비장 (spleen) (도 6d): 제 1열은 표준분자량단백질이고, 각각 Sim2-Gal4에 의한 전달: CD8-z(a), Lck(e); Mph1-Gal4에 의한 전달: CD8-z(b), Lck(f); Tat-Gal4에 의한 전달: CD8-z(c), Lck(g); R7-Gal4에 의한 전달: CD8-z(d), Lck(h) 이다.
- <64> 실시예 6: Sim2-Gal4, Mph1-Gal4, Tat-Gal4 또는 R7-Gal4에 의하여 생체내 (*in vivo*)에 서 목적 DNA의 세포 특이적 발현
- <65> 실시예 1에서 제작된 pL-CD8-z-GBS, pL-Lck-GBS, pL-INS-GBS DNA구조를 선형화시킨 후, Sim2-Gal4, Mph1-Gal4, Tat-Gal4 또는 R7-INS-Gal4 융합단백질과의 결합복합체를 37℃에서 만든 후, C57B6 마우스의 복강에 0.5mg/ml의 농도를 주사하였다. 4시간 경과 후 간, T세포, B 세포등을 척출 또는 분리한 후 이들로부터 발현된 CD8-z, Lck, 인슐린 단백질의 발현을 이들에 대한 mAb를 이용한 웨스턴블롯을 이용하여 검출하였다. 이들에 대한 결과를 인슐린을 제외하고 도 7a 내지 도 7c에 나타내었다.
- <66> i) T세포 (도 7a): 제 1열은 표준분자량단백질이고, 각각 Sim2-Gal4에 의한 전달: CD8-z(a), Lck(e); Mph1-Gal4에 의한 전달: CD8-z(b), Lck(f); Tat-Gal4에 의한 전달: CD8-z(c), Lck(g); 및 R7-Gal4에 의한 전달: CD8-z(d), Lck(h) 이다.

<67> ii) B세포 (도 7b): 제 1열은 표준분자량단백질이고, 각각 Sim2-Gal4에 의한 전달:

CD8-z(a), Lck(e); Mph1-Gal4에 의한 전달: CD8-z(b), Lck(f); Tat-Gal4에 의한 전달:

CD8-z(c), Lck(g); R7-Gal4에 의한 전달: CD8-z(d), Lck(h) 이다.

<68> iii) 간세포 (도 7c): 제 1열은 표준분자량단백질이고, 각각 Sim2-Gal4에 의한 전달:

CD8-z(a), Lck(e); Mph1-Gal4에 의한 전달: CD8-z(b), Lck(f); Tat-Gal4에 의한 전달:

CD8-z(c), Lck(g); R7-Gal4에 의한 전달: CD8-z(d), Lck(h) 이다.

<69> 상기 제조된 Sim2-Gal4, Mph1-Gal4, Tat-Gal4 또는 R7-Gal4 융합단백질과 pL-CD8-z-GBS, pL-Lck-GBS, 및 pL-INS-GBS DNA구조의 복합체를 C57B6 마우스에 0.5mg/ml을 표피를 통하여 주입하였다. 6시간 경과 후, 간, T세포, B세포등을 척출 또는 분리한 후 이들로부터 발현된 CD8-z, Lck, 인슐린 단백질의 발현을 이들에 대한 mAb를 이용한 웨스턴블롯으로 검출하였다. 그 결과를 도 8a 내지 도 8c에 나타내었다.

<70> i) T세포 (도 8a): 제 1열은 표준분자량단백질이고, 각각 Sim-2-Gal4에 의한 전달:

CD8-z(a), Lck(e); Mph1-Gal4에 의한 전달: CD8-z(b), Lck(f); Tat-Gal4에 의한 전달:

CD8-z(c), Lck(g); R7-Gal4에 의한 전달: CD8-z(d), Lck(h) 이다.

<71> ii) B세포 (도 8b): 제 1열은 표준분자량단백질이고, 각각 Sim2-Gal4에 의한 전달:

CD8-z(a), Lck(e); Mph1-Gal4에 의한 전달: CD8-z(b), Lck(f); Tat-Gal4에 의한 전달:

CD8-z(c), Lck(g); R7-Gal4에 의한 전달: CD8-z(d), Lck(h) 이다.

<72> iii) 간세포 (도 8c): 제 1열은 표준분자량단백질이고, 각각 Sim2-Gal4에 의한 전달:

CD8-z(a), Lck(e); Mph1-Gal4에 의한 전달: CD8-z(b), Lck(f); Tat-Gal4에 의한 전달:

CD8-z(c), Lck(g); R7-Gal4에 의한 전달: CD8-z(d), Lck(h) 이다.

【발명의 효과】

- 73> 본 발명은 PTD 및 특정 DNA/RNA 서열에 결합가능한 DNA/RNA 결합인자 또는 그 일부분인 DNA/RNA 결합도메인을 지닌 결합단백질과의 융합단백질, 생체내로 전달하고자하는 생체기능조절물질과 상기 DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인과 특이적으로 결합하는 DNA/RNA 결합서열 둘 모두를 포함하는 DNA/RNA 구조를 이용하여 생체내 및 생체외에서 진행 또는 원핵세포 내부의 세포질 또는 핵 내로 근육내 (intramuscular), 복막내 (Intraperitoneal), 정맥내 (Intravein), 경구 (Oral), 비내 (nasal), 피하 (subcutaneous), 피내 (intradermal), 점막 (mucosal) 또는 흡입 (inhale) 등을 포함한 다양한 경로를 통하여 DNA를 효과적으로 전달할 수 있는 기술로써, DNA/RNA 백신의 개발 및 유전자치료등의 임상적 응용뿐만아니라 특정유전자를 세포내에서 안정적으로 또는 일시적으로 발현시켜 이들로부터 발현된 단백질의 기능을 연구하기 위한 기초연구에 유용하게 사용할 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인을 지닌 동종 또는 이종의 하나 이상의 결합 단백질과 PTD의 융합단백질; 및

상기 DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인과 특이적으로 결합하는 DNA/RNA 결합서열, 및 생체기능조절물질을 코딩하는 DNA/RNA가 결합된, 세포질 또는 핵내로 DNA/RNA를 전달하기 위한 결합복합체.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 뉴클리어 로컬라이제이션 (Nuclear localization sequence) (NLS)이 융합단백질의 PTD와 추가로 결합됨을 특징으로 하는 결합복합체.

【청구항 3】

제 1항 또는 제 2항 있어서, PTD가 Mph-1, Sim-2, Tat, R7, VP22, ANTP, Pep-1 및 Pep-2로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나임을 특징으로 하는 결합복합체.

【청구항 4】

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 생체기능조절물질이 특정 종 (species), 조직, 장기, 또는 세포에서 특이적으로 유전자를 발현시키는 프로모터 또는 인핸서 임을 특징으로 하는 결합복합체.

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 프로모터가 유도성 (inducible) 프로모터 또는 인핸서 임을 특징으로 하는 결합복합체.

【청구항 6】

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 생체내에서 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막 또는 흡입을 포함하는 투여경로에 의해 세포질 또는 핵내로 전달됨을 특징으로 하는 결합복합체.

【청구항 7】

i) DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인을 지닌 동종 또는 이종의 하나 이상의 결합단백질 및 PTD를 각각 코딩하는 DNA, 및 발현조절서열이 작동적으로 결합된 물질전달 재조합 발현백터를 제조하는 단계;

ii) 상기 단계 i)의 물질전달 재조합 발현백터를 숙주세포에서 발현시켜 융합단백질을 수득하는 단계;

iii) 상기 단계 ii)의 융합단백질과 단백질, DNA/RNA, 지방, 탄수화물, 및 화학화합물로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 생체기능조절물질을 화학적 또는 물리적 공유 또는 비공유 결합에 의해 연결시켜 결합복합체를 수득하는 단계; 및

iv) 상기 단계 iii)의 결합복합체를 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막 또는 흡입을 포함하는 투여 경로를 통해 생체내로 또는 생체외에서 세포의 배양물과 혼합 배양시키는 단계를 포함하여, 생체기능조절물질을 진핵세포 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 안으로 전달하는 방법.

【청구항 8】

i) DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인을 지닌 동종 또는 이종의 하나 이상의 결합단백질 및 PTD를 코딩하는 DNA, 및 발현조절서열이 작동적으로 결합된 물질전달 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계;

ii) 상기 단계 i)의 물질전달 재조합 발현벡터를 숙주세포에서 발현시켜 융합단백질을 수득하는 단계;

iii) 생체기능조절물질을 코딩하는 DNA 및 상기 DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인과 특이적으로 결합하는 DNA/RNA 결합서열 둘 모두를 포함하고, 발현조절서열이 작동적으로 결합된 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;

iv) 상기 단계 ii)에서 수득한 융합단백질과 단계 iii)의 재조합 발현벡터를 결합시켜 결합복합체를 수득하는 단계; 및

v) 상기 단계 iv)의 결합복합체를 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막 또는 흡입을 포함하는 투여 경로를 통해 생체내로 또는 생체외에서 세포의 배양물과 혼합 배양시키는 단계를 포함하여, 생체기능조절물질을 진핵세포 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 안으로 전달하는 방법.

【청구항 9】

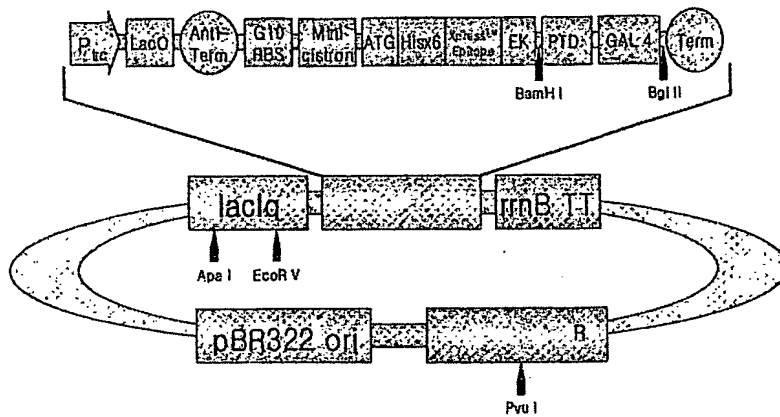
제 7항 또는 제 8항에 있어서, 단계 ii)에서 뉴클리어 로컬라이제이션 서열을 융합단백질의 PTD와 결합시키는 단계를 추가로 포함함을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

DNA/RNA 결합인자 또는 DNA/RNA 결합도메인을 지닌 동종 또는 이종의 하나 이상의 결합 단백질 및 PTD를 코딩하는 DNA, 및 발현조절서열이 작동적으로 결합된 물질전달 재조합 발현벡터.

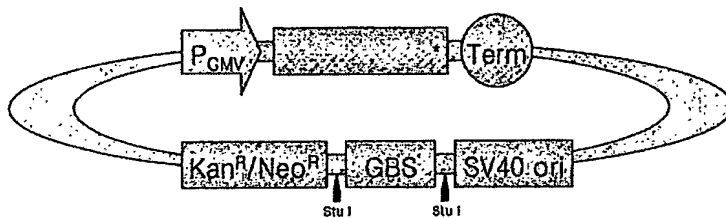
【도면】

【도 1a】



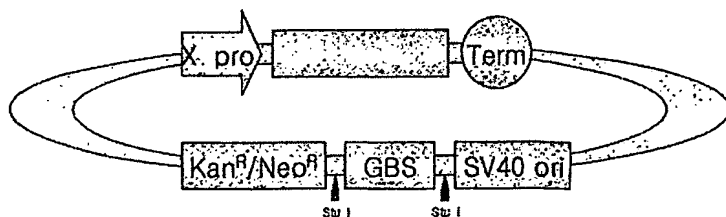
PTD는 a) Sim-2, b) Mph-1, c) Tat, d) R7을 코딩하는 염기서열

【도 1b】



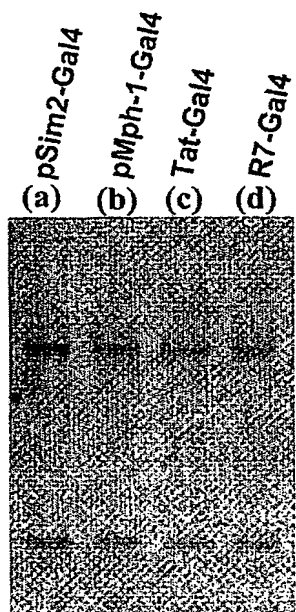
Target gene 은 각각 e) CD8-z, f) Lck를 코우딩하는 염기서열로 이루어짐.

【도 1c】

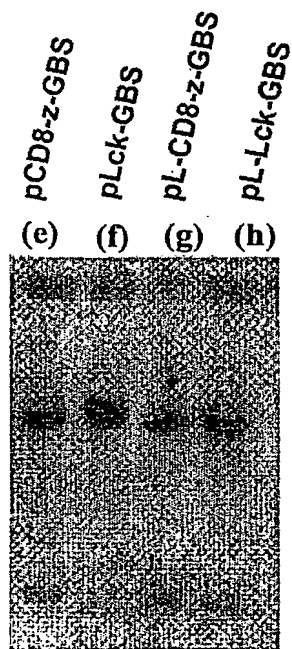


X pro는 T 세포 특이적인 발현을 조절할 수 있는 human CD2 promoter를 나타내며 Target gene 은 각각 g) CD8-z, h) Lck를 코우딩하는 염기서열로 이루어짐.

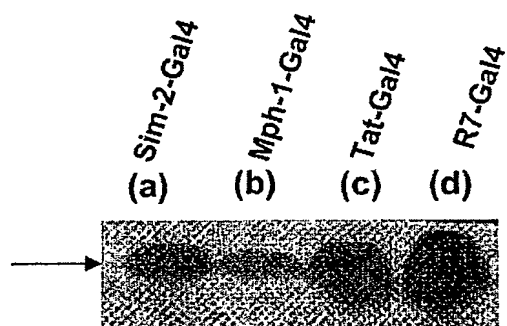
【도 2a】



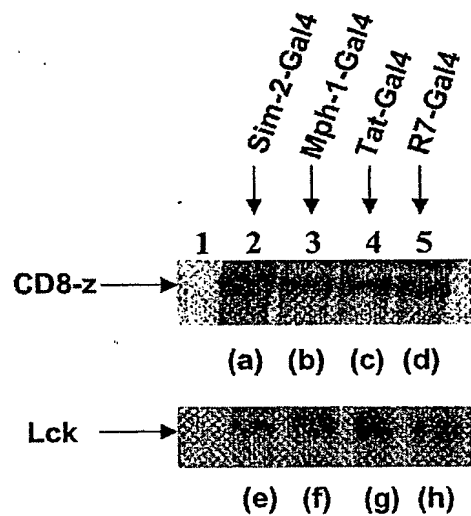
【도 2b】



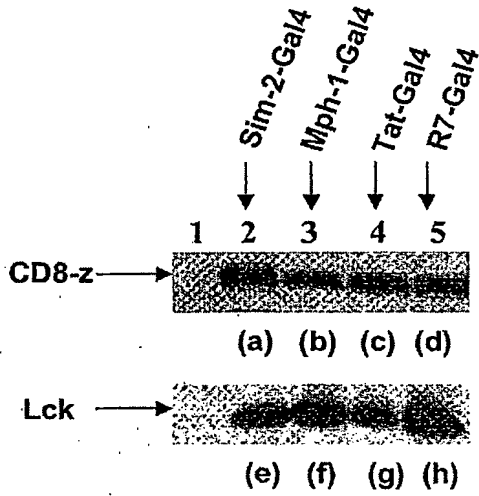
【도 3】



【도 4】

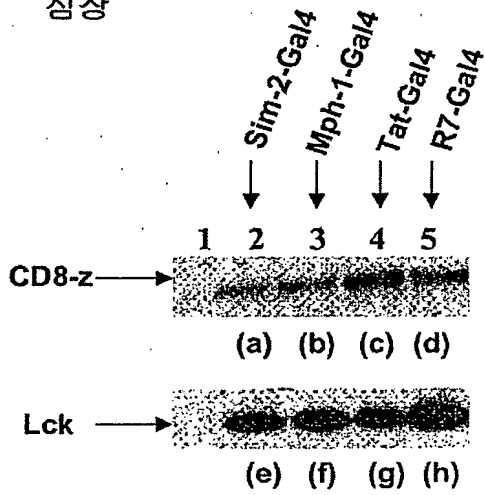


【도 5】



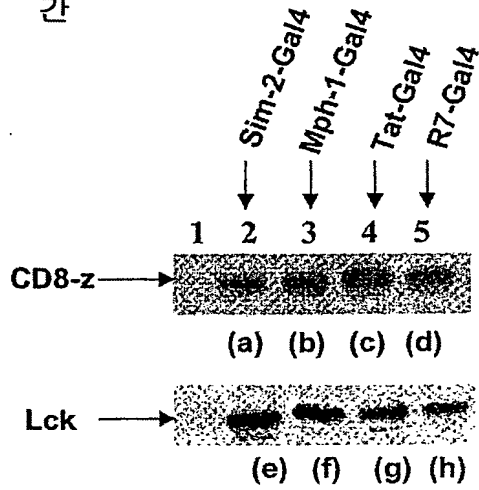
【도 6a】

심장



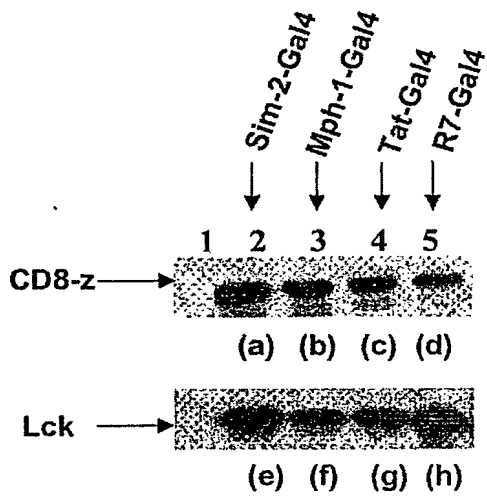
【도 6b】

간



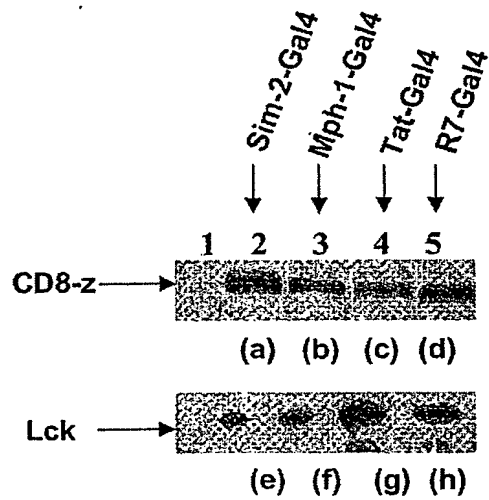
【도 6c】

신장



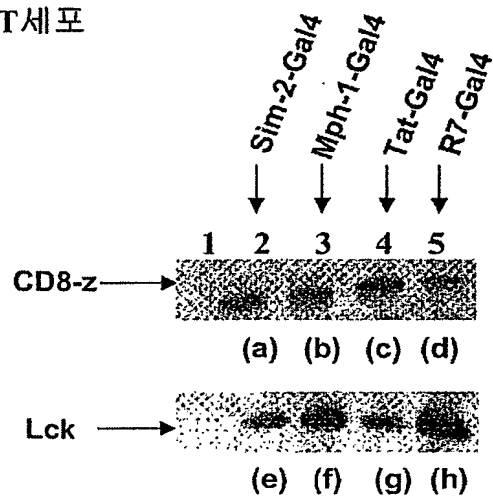
【도 6d】

Spleen

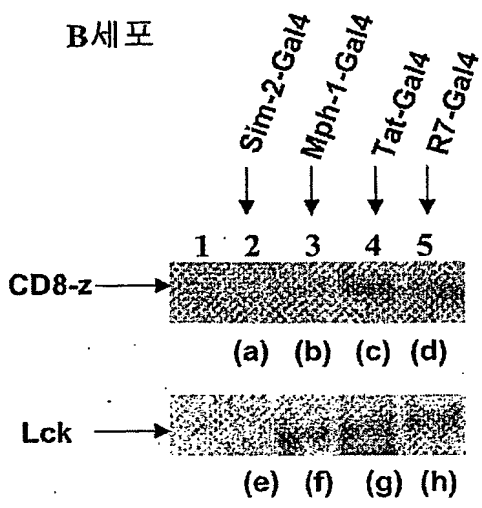


【도 7a】

T세포

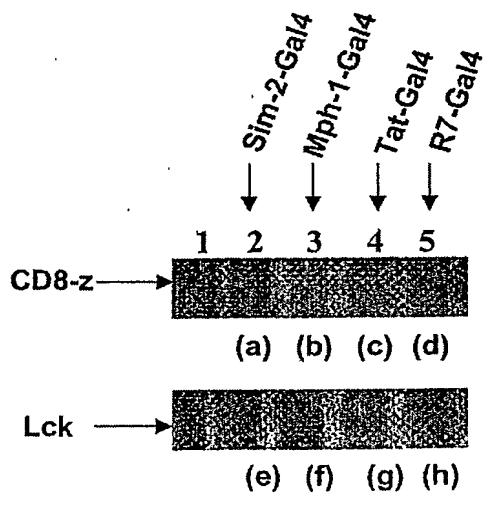


【도 7b】



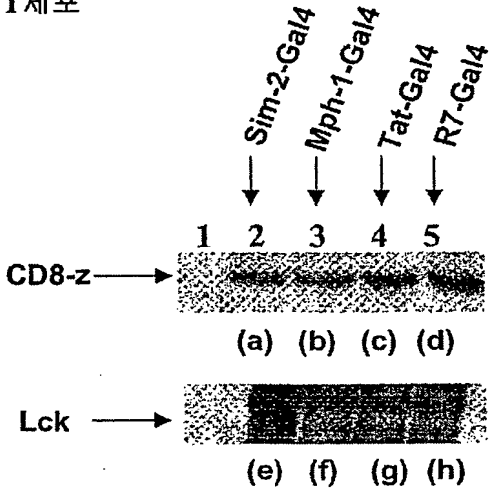
【도 7c】

간세포



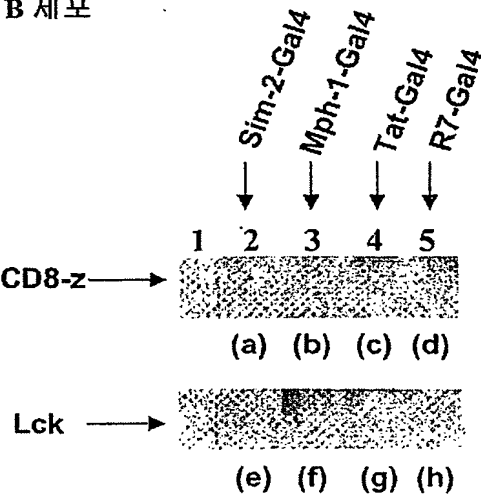
【도 8a】

T세포



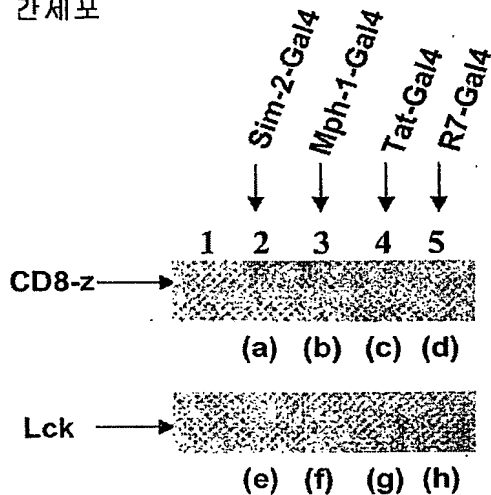
【도 8b】

B 세포



【도 8c】

간세포



【서열목록】

<110> FORHUMAN TECH CO. LTD. <120> DNA/RNA TRANSDUCTION TECHNOLOGY AND ITS
 CLINICAL AND BASIC APPLICATIONS <160> 7 <170> KopatentIn 1.71 <210>
 1 <211> 75 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Designed
 nucleic acid sequence to act as a 5' primer for preparing pSim2-Gal4 <400>
 1 cgcgatccg ccaaagccgc ccgccaggcc gcccggaagc tactgtcttc tatcgaacaa 60
 gcatgcgata tttgc 75 <210>
 2 <211> 81 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Designed
 nucleic acid sequence to act as a 5' primer for preparing pMph1-Gal4 <400>
 2 cgcgatcct atgcacgtgt tcggaggcgt ggaccccgcc gcaagctact gtcttctatc 60
 gaacaagcat gcgatatttg c 81 <210>

3 <211> 84 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Designed
nucleic acid sequence to act as a 5' primer for preparing pTat-Gal4 <400>

3 cgcggtatcct atggaaggaa gaagaagcgg agacaaagac gacgaaagct actgtcttct 60
atcgaacaac gatgcatat ttgc 84 <210>

4 <211> 69 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Designed
nucleic acid sequence to act as a 5' primer for preparing pR7-Gal4 <400>

4 cgcggtatcca gaagaagaag aagaagaaga aagctactgt cttctatcga acaacgatgc 60
gatatttgc 69 <210>

5 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Designed
nucleic acid sequence to act as a 3' primer for preparing pSim2-Gal4,

pMph1-Gal4, pR7-Gal4 and pTat-Gal4 <400> 5 ggaagatctc ggcgatacag t

21 <210> 6 <211> 16 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Designed nucleic acid sequence to act as a 5' primer for preparing Gal4

Binding Sequence (GBS) <400> 6 aaggcctctc gaggac

16 <210> 7 <211> 16 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Designed nucleic acid sequence to act as a 3' primer for preparing Gal4

Binding Sequence (GBS) <400> 7 aaggcctttt agcttc